



**UJI SITOTOKSISITAS *PERIODONTAL DRESSING* YANG MENGANDUNG
EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO 15% TERHADAP KULTUR SEL
FIBROBLAS *BABY HAMSTER KIDNEY-21* (BHK-21)**

SKRIPSI

Oleh:

Veda Chandrika Adnyana

131610101071

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Melok Aris, M. Kes., Sp. Perio

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Tantin Ermawati, M. Kes.

Penguji

Dosen Penguji Ketua : Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes.

Dosen Penguji Anggota : drg. Dwi Merry Christmarini R., M. Kes.

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2017



**UJI SITOTOKSISITAS *PERIODONTAL DRESSING* YANG MENGANDUNG
EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO 15% TERHADAP KULTUR SEL
FIBROBLAS *BABY HAMSTER KIDNEY-21* (BHK-21)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Pendidikan S-1 Pendidikan Dokter Gigi
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Veda Chandrika Adnyana

131610101071

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

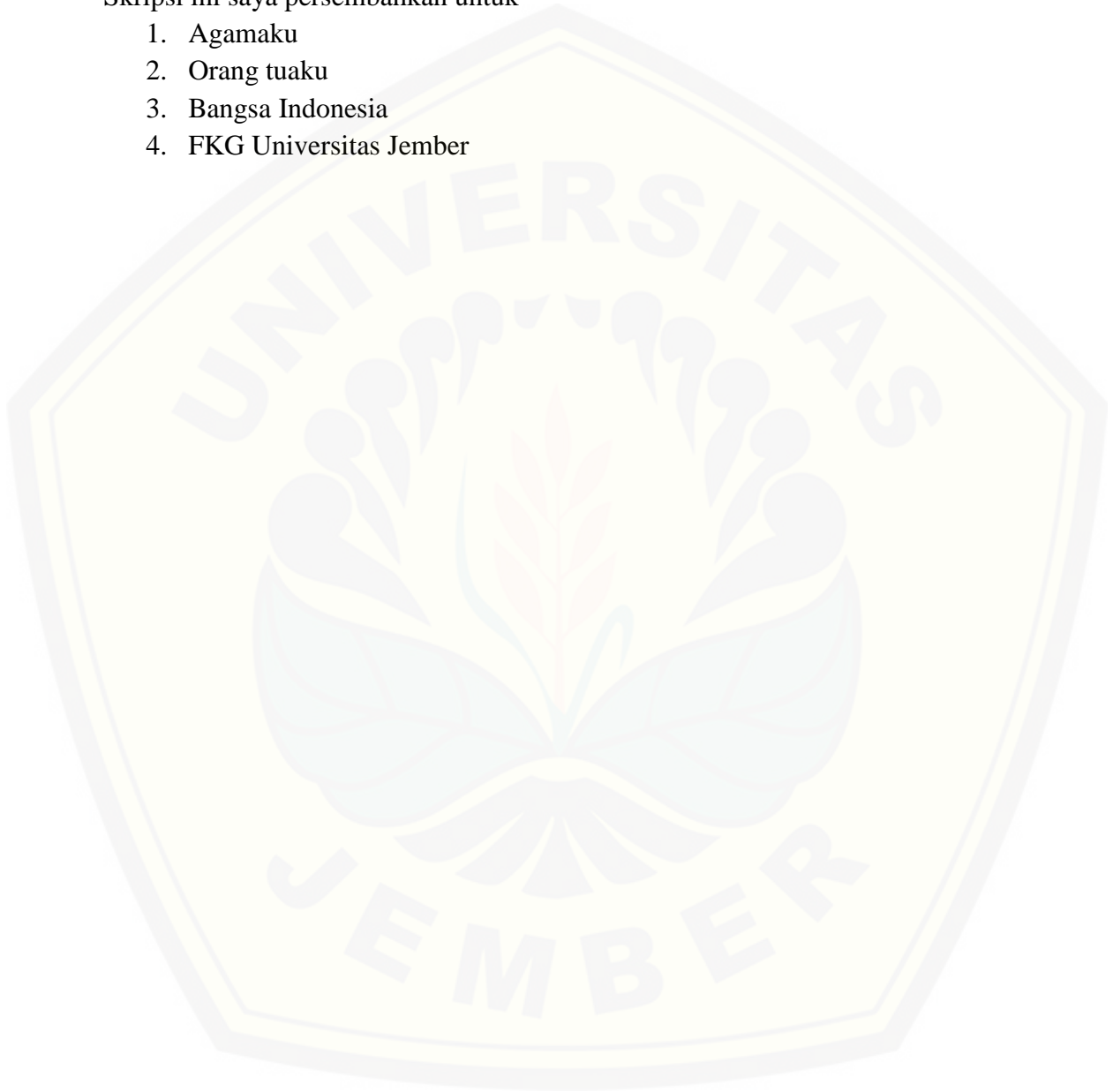
2017

ii

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk

1. Agamaku
2. Orang tuaku
3. Bangsa Indonesia
4. FKG Universitas Jember



MOTTO

Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman Tuhan, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan.)*



*) Yeremia 29:11

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Veda Chandrika Adnyana

Nim : 131610101071

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Uji Sitotoksitas Periodontal Dressing yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% terhadap Kultur Sel Fibroblas Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21)* adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan skripsi ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 April 2017

Yang menyatakan,

Veda Chandrika Adnyana

NIM 131610101071

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS *PERIODONTAL DRESSING* YANG MENGANDUNG
EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO 15% TERHADAP KULTUR SEL
FIBROBLAS *BABY HAMSTER KIDNEY-21* (BHK-21)**

Oleh

Veda Chandrika Adnyana

NIM 131610101071

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Melok Aris, M. Kes., Sp. Perio

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Tantin Ermawati, M. Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Uji Sitotoksitas Periodontal Dressing yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% terhadap Kultur Sel Fibroblas Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Kamis, 27 April 2017

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes.
NIP 197007052003122001

drg. Dwi Merry Christmarini R., M. Kes.
NIP 197712232008122002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Melok Aris W., M. Kes., Sp. Perio
NIP 197104092005012002

drg. Tantin Ermawati, M. Kes
NIP 198003222008122003

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. R Rahardyan Parnaadji, M. Kes, Sp. Pros
NIP 196901121996011001

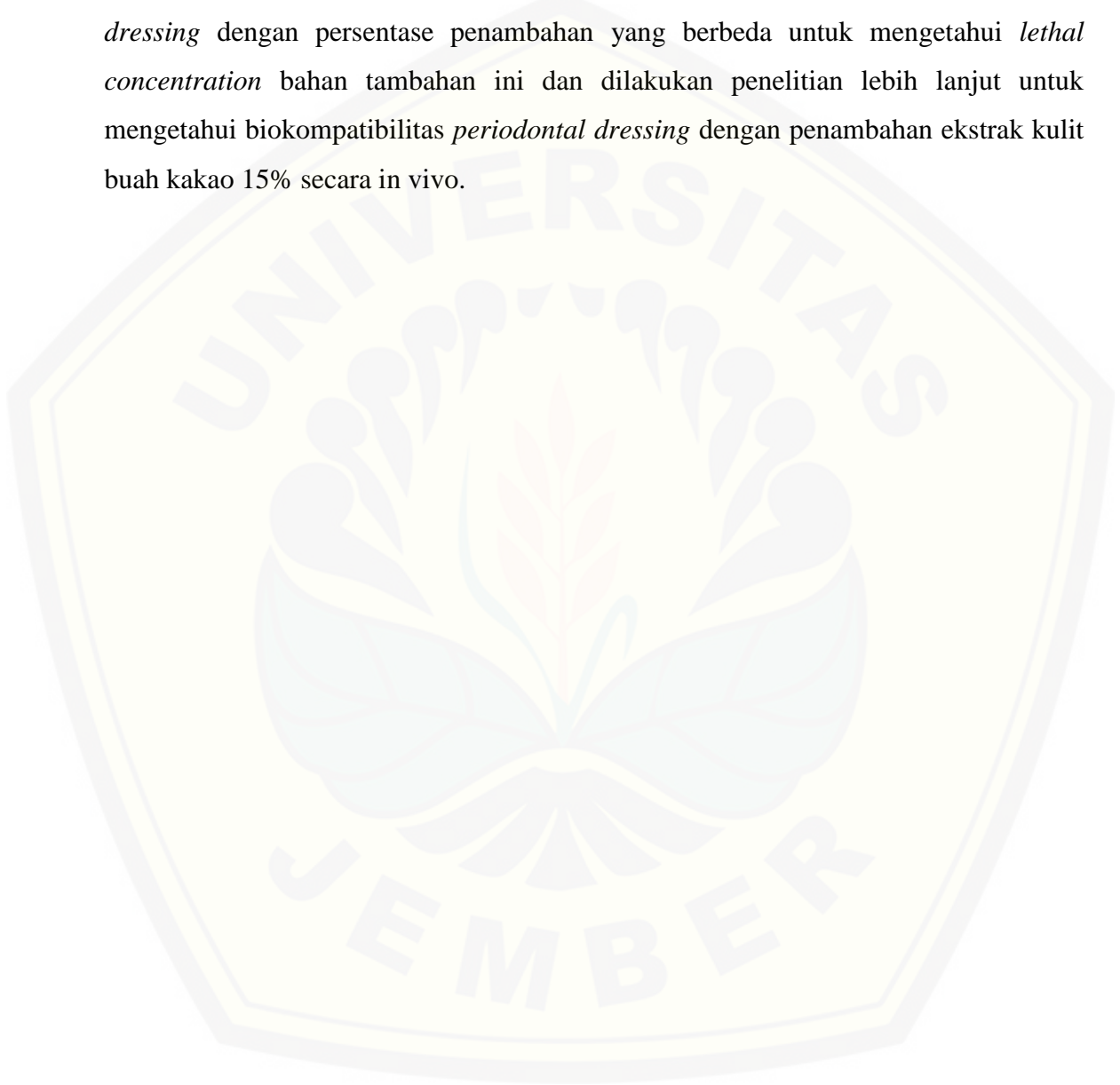
RINGKASAN

(Uji Sitotoksisitas *Periodontal Dressing* yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% terhadap Kultur Sel Fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21)); (Veda Chandrika Adnyana); (131610101071); 2016; 39 halaman

Periodontal dressing merupakan bahan yang diaplikasikan setelah prosedur bedah periodontal. *Periodontal dressing* yang biasa digunakan tidak mengandung bahan yang dapat mempercepat penyembuhan luka. Penelitian mengenai penambahan ekstrak kulit buah kakao 15% dalam *periodontal dressing* untuk mempercepat penyembuhan luka telah dilakukan secara *in vivo* pada gingiva kelinci. Senyawa aktif flavonoid dapat mempercepat terjadinya proses penyembuhan luka. Sebelum diaplikasikan pada manusia, bahan yang telah diuji pada hewan coba, harus diuji biokompabilitasnya terlebih dahulu. Biokompabilitas bahan dapat ditentukan melalui uji sitotoksisitas dengan metode MTT pada kultur sel fibroblas BHK-21. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15%.

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris dengan rancangan *the post-test only control group design* dan dilaksanakan di Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan PUSVETMA (Surabaya). Setiap kelompok *periodontal dressing* direndam dalam saliva steril. Hasil rendaman diaplikasikan ke dalam sumuran yang berisi sel fibroblas BHK-21 dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, tiap sumuran diberi garam MTT dan diinkubasi selama 3-4 jam. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pembacaan nilai *Optical Density* (OD) menggunakan *Elissa reader*. Efek sitotoksisitas diukur dengan menghitung OD dalam rumus viabilitas sel (%). Data dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji LSD. Berdasarkan hasil perhitungan, setiap kelompok memiliki nilai viabilitas sel diatas 90% hal ini berarti *periodontal dressing*

yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% tidak memiliki efek sitotoksik. Saran dari penelitian ini yaitu perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penambahan ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) pada *periodontal dressing* dengan persentase penambahan yang berbeda untuk mengetahui *lethal concentration* bahan tambahan ini dan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui biokompatibilitas *periodontal dressing* dengan penambahan ekstrak kulit buah kakao 15% secara *in vivo*.



PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas *Periodontal Dressing* yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% terhadap Kultur Sel Fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tiada terhingga kepada:

1. drg. Melok Aris Wahyukundari, M. Kes., Sp. Perio selaku Dosen Pembimbing Utama, terima kasih telah memberikan motivasi, petunjuk, dan dengan sabar membimbing sampai terselesaikan skripsi ini.
2. drg. Tantin Ermawati, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping, terima kasih telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta bimbingannya dalam penulisan skripsi.
3. Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Dwi Merry Christmarini R., M. Kes selaku Dosen Penguji Anggota, terima kasih telah memberikan arahan, masukan, kritik dan saran kepada penulis untuk kesempurnaan skripsi ini.
4. drg. Yenny Yustisia, M. Biotech selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses perkuliahan.
5. Orang tua saya, yang telah menjadi sahabat sekaligus orang tua terbaik, berjuang keras demi keberhasilanku, memberikan dukungan moril dan materil, serta semangat, juga memberikan kasih sayang yang sangat luar biasa.
6. Kakak saya, dr. Michelle Prinka sekeluarga yang membuatku selalu belajar kasih sayang dan kelapangan hati untuk saling memaafkan.

7. Keluarga tante di Surabaya, terimakasih karena telah membantu memberikan sarana, doa, dan dukungan selama penelitian di Surabaya sehingga penelitian dapat berlangsung dengan lancar.
8. Oma, yang selalu menemani, mendukung, mendoakan, dan merawat saya selama ini.
9. drg. Bryan Satria Prima, terimakasih karena selalu ada buatku, menghibur, memberi nasehat, membantu memeriksa penulisan skripsi ini, membantu penelitian, mendoakan, dan mendukung.
10. Teman-teman seperjuangan: Pratita, Salma, Atika, Miftachul, Karina, Asti, Clara, Tira, Dessy, Farah, Elga, terima kasih atas dukungan kalian, dan juga Dienda terima kasih atas bantuannya yang bersedia menjadi responden dalam penelitian ini.
11. Teman-teman angkatan 2013 atas segala kebersamaan
12. Teman-teman PMKK FKG atas waktunya untuk saling sharing, menguatkan dan mendoakan
13. Semua pihak yang terlibat baik langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini

Penulis merasa penulisan skripsi ini belum sempurna, karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 April 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Periodontal Dressing</i>.....	5
2.1.1 Fungsi <i>Periodontal Dressing</i>	5
2.1.2 Syarat <i>Periodontal Dressing</i>	5
2.1.3 Jenis <i>Periodontal Dressing</i>	6
2.1.4 Komposisi <i>Periodontal Dressing</i> (Formula Baer).....	7
2.1.5 Teknik Manipulasi <i>Periodontal Dressing</i>	8
2.2 Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	9

2.2.1 Klasifikasi Kakao.....	10
2.2.2 Varietas Kakao.....	10
2.2.3 Kulit Kakao.....	11
2.2.4 Kandungan Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	11
2.3 Periodontal dressing yang mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao	14
2.4 Biokompabilitas.....	15
2.5 Uji Sitotoksitas.....	15
2.6 Kultur Sel.....	17
2.7 Sel Fibroblas	18
2.8 Sel Fibroblas BHK-21.....	19
2.9 Kerangka Konsep	20
2.10 Penjelasan Kerangka Konsep	21
2.11 Hipotesis.....	21
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Jenis Penelitian.....	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2.1 Tempat Penelitian	22
3.2.2 Waktu Penelitian.....	22
3.3 Identifikasi Penelitian.....	22
3.3.1 Variabel Bebas	22
3.3.2 Variabel Terikat	22
3.3.3 Variabel Terkendali	22
3.4 Definisi Operasional.....	23
3.4.1 Ekstrak Kulit Buah Kakao	23
3.4.2 <i>Periodontal Dressing</i>	23
3.4.3 Sel fibroblas	23

3.4.4 Sitotoksisitas	23
3.5 Sampel Penelitian.....	24
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	25
3.6.1 Alat Penelitian.....	25
3.6.2 Bahan Penelitian	25
3.7 Prosedur Penelitian.....	26
3.7.1 Tahap Persiapan	26
3.7.2 Tahap Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	26
3.7.3 Tahap Pembuatan Saliva	26
3.7.4 Tahap Pembuatan <i>Periodontal Dressing</i> Coe-Pak	27
3.7.5 Tahap Pembuatan <i>Periodontal Dressing</i>	27
3.7.6 Tahap Pembuatan <i>Periodontal Dressing</i> yang Ekstrak Kulit Buah Kakao.....	27
3.7.7 Tahap Perendaman <i>Periodontal Dressing</i> Dalam Saliva	27
3.7.8 Tahap Uji Sitotoksisitas	28
3.7.9 Analisis Data.....	30
3.7.10 Alur Penelitian Uji Sitotoksisitas.....	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil Penelitian.....	32
4.2 Pembahasan.....	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Kulit Buah Kakao	11
4.1 Hasil pembacaan <i>Optical Density</i> (OD) terhadap sel fibroblas BHK-21 pada kelompok perlakuan dan kontrol	32
4.2 Rata-rata persentase (%) kehidupan sel setelah perlakuan	33
4.3 Hasil uji <i>Levene Test</i>	35
4.3 Hasil uji LSD	36

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mempersiapkan <i>periodontal dressing</i> (Coe-Pak)	9
2.2 Pemasangan <i>periodontal dressing</i>	9
2.3 Kulit buah kakao	11
2.4 Struktur kimia katekin.....	12
2.5 Struktur kimia antosianin	13
2.6 Struktur kimia Proantosianidin	13
2.7 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan	16
2.8 Gambaran mikroskopis pada sel fibroblas BHK-21	19
4.1 Histogram rata-rata persentase kehidupan sel fibroblas BHK-21 setelah perlakuan	34
4.2. Gambaran mikroskopis dari sel fibroblas	34

DAFTAR SINGKATAN

BHK-21	= <i>baby hamster kidney-21</i>
MTT	= (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)
LSD	= <i>least significance different</i>
OD	= <i>optical density</i>
PDGF	= <i>platelet derived growth factor</i>
EGF	= <i>epidermal growth factor</i>
TGF- β	= <i>transforming growth factor beta</i>
IL	= <i>interleukin</i>
DMSO	= <i>dimethyl sulfoxide</i>
PBS	= <i>phosphate buffered saline</i>
Th1	= <i>T-helper 1</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan	49
A.1 Surat Hasil Identifikasi Kulit Buah Kakao	49
A.2 Surat Ijin Penelitian	50
B. Analisis Data	52
B.1 Hasil Uji Normalitas menggunakan Uji <i>Spahiro-Wilk</i>	52
B.2 Hasil Uji Homogenitas menggunakan <i>Levene Test</i>	52
B.3 Hasil Uji Beda Parametrik menggunakan uji <i>One-way ANOVA</i>	53
B.4 Hasil Uji Beda Parametrik antar Kelompok menggunakan uji LSD	53
C. Alat dan Bahan Penelitian	55
C1. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao	55
C.2 Pembuatan <i>Periodontal Dressing</i>	56
C.3 Tahap Penyaringan Saliva	56
C.4 Uji Sitotoksisitas	58

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bedah periodontal merupakan salah satu perawatan dalam kedokteran gigi untuk menghilangkan penyakit periodontal. Pada kebanyakan kasus, area yang telah dilakukan prosedur bedah periodontal ditutup dengan *periodontal dressing*. *Periodontal dressing* merupakan barier fisik untuk melindungi jaringan dan memberikan kesempatan jaringan untuk beradaptasi pada proses penutupan luka (David *et al.*, 2013). *Periodontal dressing* dapat mendukung proses penyembuhan dengan cara melindungi jaringan dari kemungkinan adanya infeksi, perdarahan, dan mengurangi terjadinya trauma pada saat pengunyahan (Newman *et al.*, 2015).

Material *periodontal dressing* yang umum digunakan adalah berbahan dasar *zinc oxide eugenol* dan non-eugenol. Eugenol yang terkandung dalam *periodontal dressing* dapat memicu reaksi alergi, sehingga *periodontal dressing* eugenol mulai ditinggalkan (Newman *et al.*, 2015). Contoh *periodontal dressing* yang tidak mengandung eugenol yaitu *periodontal dressing* formula Baer dan Coe-pak. Dalam penelitian ini akan dimodifikasi *periodontal dressing* formula Baer dengan komposisi powder (rosin 57%; zinc oxide 43%) dan pasta (zinc oxide 5%; hydrogenated fat 95%), karena kandungan *periodontal dressing* ini merupakan komposisi murni dari *periodontal dressing* tanpa tambahan bahan lain. Sedangkan *periodontal dressing* Coe-pak merupakan *periodontal dressing* yang telah mengandung bahan tambahan seperti *lorothidol* yang berfungsi sebagai antifungi (Kathariya *et al.*, 2014).

Periodontal dressing yang ada saat ini tidak mengandung bahan yang dapat mempercepat penyembuhan luka. *Periodontal dressing* juga dapat digunakan untuk mengaplikasikan obat-obatan secara lokal pada daerah perlukaan (Khusumawardhany, 2014). Berbagai macam bahan antimikroba seperti *terramycin*, *bacitracin*, *achromycin* telah ditambahkan ke dalam *periodontal dressing* untuk mengurangi infeksi dan mendukung proses penyembuhan luka. Akan tetapi,

penggunaan bahan antimikroba sintetik dapat memicu terjadinya sensitisasi, reaksi alergi, kandidiasis, dan resistensi, sehingga diperlukan bahan alternatif yang dapat mempercepat penyembuhan luka tanpa menimbulkan efek samping (David *et al.*, 2013).

Tumbuhan herbal merupakan salah satu alternatif bahan terapi yang saat ini sedang banyak diteliti karena relatif menimbulkan efek samping yang minimal. Salah satu tanaman di Indonesia yang berpotensi sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan antimikroba alami adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). Tanaman kakao memiliki kandungan yang bermanfaat bagi kesehatan seperti penyakit jantung dan pencegahan kanker (Corti *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2015). Limbah pertanian dalam produksi tanaman kakao terbesar yaitu kulit buah kakao. Pemanfaatan kulit buah kakao saat ini hanya sebatas untuk pakan ternak saja. Ditinjau dari komposisinya limbah tersebut mengandung senyawa seperti flavonoid, katekin, dan antosianin yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Nurkesuma, 2014; Murni *et al.*, 2012), sehingga mulai dikembangkan penggunaan kulit buah kakao dalam bidang kesehatan.

Penelitian mengenai efektifitas ekstrak kulit buah kakao dengan konsentrasi optimal 15% dalam *periodontal dressing* telah dilakukan. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* pada gingiva kelinci untuk melihat peningkatan jumlah sel fibroblas. Senyawa aktif katekin, tannin, dan antosianin yang merupakan kandungan ekstrak kulit buah kakao mampu menekan jumlah sel radang dan radikal bebas yang dihasilkan selama fase inflamasi, sehingga aktifitas migrasi dan proliferasi fibroblas terjadi lebih cepat (Izzuddin dan Nurkesuma, 2015). Namun dalam penelitian tersebut belum diteliti mengenai biokompatibilitas bahan tersebut. Biokompatibilitas secara umum ditentukan dengan uji yang menggunakan prinsip toksikologi, hal ini bertujuan untuk menyediakan informasi tentang potensi toksisitas material pada aplikasi klinis. Penentuan biokompatibilitas suatu material didapatkan melalui uji sitotoksitas (Kusumawardhany, 2014).

Uji sitotoksitas merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui apakah bahan tersebut memenuhi syarat untuk dapat diterima dalam jaringan. Pengujian

sitotoksitas yang paling sederhana dapat dilakukan dengan menguji pada kultur sel (Ma'at, 2011). Sel fibroblas memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka, sehingga pada uji sitotoksitas ini digunakan kultur sel yang berasal dari fibroblas. Kultur sel yang sering digunakan dalam uji sitotoksitas dalam bidang kedokteran gigi adalah kultur *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21) yang berasal dari fibroblas ginjal *baby hamster*. Kultur BHK-21 memiliki karakteristik mudah tumbuh dan dikultur, memiliki sifat yang stabil, dan tidak mengalami mutasi (Khoswanto *et al.*, 2008).

Uji sitotoksitas dapat dilakukan dengan metode perhitungan langsung (*direct counting*) menggunakan pengecatan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay* (Freshney, 2011). Metode yang sering digunakan yaitu uji MTT karena relatif cepat, sensitif, akurat, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar. *Tetrazolium bromide* akan direduksi oleh sel menjadi endapan formazan berwarna ungu. Semakin gelap warna endapan yang terbentuk, maka semakin tinggi angka kehidupan sel (Khoswanto *et al.*, 2008).

Penelitian pendahuluan mengenai efek sitotoksik ekstrak kulit buah kakao 15% dengan menggunakan metode MTT *assay* telah dilakukan, dan terbukti tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel fibroblas. Dalam penelitian ini, penulis ingin mengetahui apakah *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel fibroblas BHK-21.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas permasalahan yang didapat adalah apakah *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek sitotoksik *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% terhadap kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat :

1. Mengetahui efek sitotoksik *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% terhadap kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21).
2. Memberikan informasi kepada dokter gigi atau klinisi tentang manfaat ekstrak kulit buah kakao sebagai bahan alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka.
3. Sebagai tambahan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai bahan obat tradisional, khususnya untuk terapi periodontal.
4. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian di bidang kedokteran gigi lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing adalah bahan yang sering digunakan untuk menutupi luka yang timbul setelah perawatan bedah periodontal. Aplikasi *periodontal dressing* pada perlukaan jaringan pasca bedah periodontal bertujuan untuk memberikan kenyamanan pada pasien, melindungi luka selama proses penyembuhan, serta mempertahankan flap agar tetap pada posisinya (David *et al.*, 2013).

2.1.1 Fungsi *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing memiliki beberapa fungsi :

- a. Mengurangi kemungkinan terjadinya infeksi dan pendarahan pasca bedah.
- b. Membantu penyembuhan dengan jalan melindungi luka bedah dari trauma sewaktu pengunyahan.
- c. Mencegah timbulnya nyeri sakit yang dipicu oleh berkontakannya luka bedah dengan makanan atau lidah sewaktu pengunyahan (Newman *et al.*, 2015).

Penambahan bahan yang memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri pada *periodontal dressing* dapat mempercepat proses penyembuhan. Ketiganya bekerjasama dalam menurunkan efek radang yang berlebihan sehingga fase inflamasi dapat berlangsung singkat. Fase penyembuhan selanjutnya diteruskan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan meningkatnya aktifitas fibroblas dalam mensintesis serat kolagen (Izzuddin dan Nurkesuma, 2015).

2.1.2 Syarat *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing harus memenuhi syarat-syarat agar dapat diaplikasikan. Syarat-syarat dari *periodontal dressing* yaitu:

- a. Memiliki sifat plastis dan fleksibel untuk mempermudah aplikasi dan adaptasi pada rongga mulut

- b. Memiliki *setting time* yang cukup
- c. Memiliki rigiditas yang cukup guna menghindari fraktur ataupun dislokasi
- d. Memiliki permukaan yang halus sehingga tidak memudahkan retensi plak pada bahan dressing dan tidak melukai mukosa pipi dan bibir
- e. Memiliki aroma dan rasa yang dapat diterima
- f. Memiliki stabilitas dimensional yang cukup untuk menghindari kebocoran
- g. Tidak memicu timbulnya reaksi alergi
- h. Memiliki harga yang ekonomis dan mudah didapat

2.1.3 Jenis *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing dibedakan berdasarkan komposisinya yaitu :

- a. *Periodontal dressing* yang mengandung eugenol.

Periodontal dressing jenis ini didasarkan pada reaksi oksida seng dengan 23 eugenol, dan pertama kali diperkenalkan oleh Ward pada tahun 1923 dengan merek dagang Wondr-Pak®. *Periodontal dressing* ini kemudian dimodifikasi dengan penambahan bahan-bahan seperti seng asetat sebagai akselerator untuk memperbaiki waktu pengerasannya (Newman *et al.*, 2015).

Periodontal dressing oksida seng-eugenol dikemas dalam bentuk bubuk dan cairan yang harus diaduk sesaat sebelum digunakan. kandungan eugenol pada *periodontal dressing* jenis ini dapat menimbulkan reaksi alergi pada beberapa pasien (Newman *et al.*, 2015).

- b. *Periodontal dressing* yang tidak mengandung eugenol

Periodontal dressing yang tidak mengandung eugenol lebih sering dipergunakan karena cenderung tidak bersifat iritan. Jenis ini didasarkan pada reaksi antara oksida logam dengan asam lemak. Contoh *Periodontal dressing* yang tidak mengandung eugenol yaitu *periodontal dressing* yang mengandung oksida seng dan asam lemak tidak jenuh dari kelapa. Contoh *periodontal dressing* jenis ini adalah Coe-Pak®. *Periodontal dressing* ini dikemas dalam bentuk 2 *tube* pasta yaitu pasta basis dan pasta akselerator. Pasta basis mengandung asam lemak, rosin,

chlorothymol, zinc asetat, dan alkohol. Pasta akselerator mengandung zinc oxide, lorotheidol, silica, *vegetables oil*, dan coumarin. Lorotheidol yang terkandung dalam *periodontal dressing* Coe-pak bekerja sebagai antifungi. Zinc asetat ditambahkan dalam *periodontal dressing* ini untuk mempercepat waktu pengerasan (Kathariya *et al.*, 2014). *Periodontal dressing* Coe-pak didapatkan dengan mengaduk kedua pasta sampai diperoleh warna yang merata (Newman *et al.*, 2015). Kekurangan dari *periodontal dressing* ini yaitu daya perlekatannya kurang baik sehingga dapat menyebabkan akumulasi plak (Baghani dan Kadkhodazadeh, 2013).

2.1.4 Komposisi *Periodontal Dressing* (Formula Baer)

Formula Baer merupakan komposisi utama yang digunakan dalam membuat *periodontal dressing*. Formula Baer tidak memiliki kandungan eugenol dan diperkenalkan oleh Baer dengan komposisi powder campuran antara zinc oxide sebanyak 43% dan rosin 57%. Pasta dengan komposisi zinc oxide sebanyak 5% dan hydrogenated fat 95%. Selanjutnya dapat ditambahkan beberapa bahan lain untuk mendapatkan plastisitas dan kepaduan (Prichard, 1972). Dalam penelitian ini akan digunakan *periodontal dressing* Formula Baer karena kandungan dalam *periodontal dressing* ini merupakan komposisi murni dari *periodontal dressing* tanpa adanya tambahan bahan lain (Kathariya *et al.*, 2014). Kekurangan dari *periodontal dressing* ini yaitu waktu pengerasan lebih lama dibandingkan dengan *periodontal dressing* yang saat ini digunakan.

Periodontal dressing formula Baer dan Coe-Pak terbukti tidak menimbulkan reaksi toksik pada mukosa rongga mulut dari hasil penelitian *in vivo* menggunakan tikus. Coe-Pak merupakan *periodontal dressing* yang telah terstandarisasi dan umum digunakan pada praktek kedokteran gigi sehingga dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif (Kusumawardhany *et al.*, 2014).

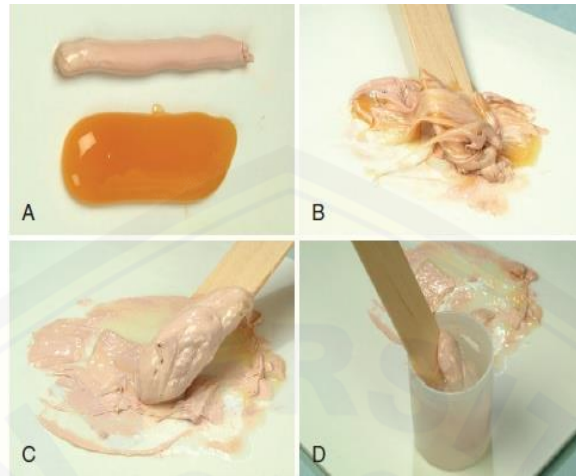
2.1.5 Teknik Manipulasi *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing yang mengandung oksida seng berbentuk bubuk dicampur dengan cairannya (yang mengandung eugenol atau tidak) diatas blok kertas berlilin dan diaduk dengan pengaduk kayu. Bubuk ditambah sedikit demi sedikit sampai didapat pasta yang cukup kental (Newman *et al.*, 2015).

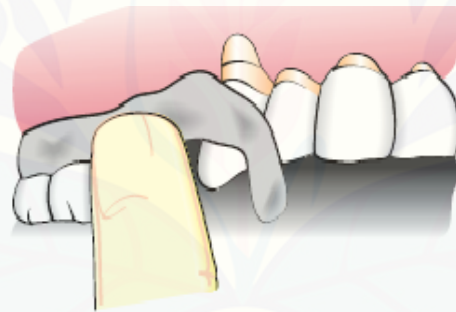
Periodontal dressing formula Baer didapatkan dengan cara mencampurkan powder dan pasta. Powder didapatkan dengan mencampur zinc oxide sebanyak 43% dan rosin 57%. Pasta didapatkan dengan mencampur zinc oxide sebanyak 5% dan hydrogenated fat 95%. Powder dan pasta diaduk hingga homogen, setelah 5-7 menit maka *periodontal dressing* Formula Baer dapat dibentuk (Nurkesuma, 2014).

Periodontal dressing yang dikemas dalam bentuk dua tube pasta seperti Coe-Pak® dipersiapkan dengan mencampur pasta basis dan pasta akselerator sama panjang, yang diaduk sampai didapatkan warna yang merata. Setelah 2-3 menit pasta yang telah diaduk sudah dapat dibentuk dan ditempatkan di atas luka (Newman *et al.*, 2015).

Periodontal dressing yang diaduk maupun yang sudah siap pakai lebih dulu dibentuk menjadi batangan sepanjang luka bedah yang hendak dibalut. Agar *periodontal dressing* tidak melekat ke tangan, jari tangan sebaiknya diolesi vaselin. Dengan lebih dulu mengeringkan daerah luka bedah, batangan *periodontal dressing* ditempatkan pada daerah luka bedah hingga sepertiga apikal mahkota klinis gigi tertutup. Penutupan luka diperluas hingga apikal agar seluruh daerah operasi tertutup tanpa mengganggu lipatan mukobukal atau dasar mulut. Dengan menggunakan aplikator berujung kapas yang telah dibasahi, tekan *dressing* perlahan-lahan agar beradaptasi dengan baik di daerah proksimal (Newman *et al.*, 2015). (Gambar 2.1 dan 2.2)



Gambar 2.1 Mempersiapkan *periodontal dressing* (Coe-Pak) (A) Panjang kedua pasta sama pada *paper pad*; (B) Pasta di aduk dengan menggunakan pengaduk kayu 2-3 menit hingga homogen (C); (D) Pasta di masukkan dalam air bersuhu kamar (Sumber: Newman *et al.*, 2015)



Gambar 2.2 Pemasangan *periodontal dressing* (Sumber: Newman *et al.*, 2015).

2.2 Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao berasal dari daerah hutan tropis hulu sungai Amazon. Tanaman kakao hidup pada hutan hujan tropis yang terlindung di bawah pohon besar, suhu tidak terlalu tinggi, kelembapan cukup, dan angin tidak terlalu kencang (Susanto, 1994). Pada era modern ini tanaman kakao dimanfaatkan dalam bidang industri pangan, industri farmasi dan industri kosmetika (PPKKI, 2010).

2.2.1 Klasifikasi Kakao

Dalam taksonomi, kakao diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Malvales/Columniferae</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

(Tjitrosoepomo, 2007)

2.2.2 Varietas Kakao

Secara garis besar varietas kakao dibagi menjadi dua tipe besar, yaitu :

a. Criollo

Criollo sering kali disebut sebagai “pangeran” kakao karena memiliki kualitas yang tinggi dengan aroma dan cita rasanya sendiri. Kebanyakan criollo tumbuh di Amerika Tengah dan Karibia. Varietas criollo yang ada di Indonesia dikenal dengan kakao mulia atau edel kakao atau *fine flavour cacao* dan memiliki buah berwarna merah (Ide, 2008).

b. Forastero

Forastero umumnya termasuk kakao bermutu rendah atau disebut kakao curah atau *bulk cacao* (Susanto, 1994). Jenis kakao ini lebih tahan, mudah pengolahannya dan lebih banyak tumbuh di muka bumi, terutama Brazil dan Afrika. Jenis Forastero dikenal sebagai penghasil biji kakao lindak. Kakao lindak merupakan kakao kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer (pelengkap) dalam mengolah kakao mulia. Meskipun termasuk kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer, kakao lindak mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia (Ide, 2008).

2.2.3 Kulit Kakao

Kulit buah kakao memiliki 10 alur dalam dan dangkal yang terletak berselang seling. Pada tipe criollo kulit buah tebal tetapi lunak, permukaannya kasar, dan alur buah terlihat jelas. Sebaliknya, pada tipe forastero permukaan kulit pada umumnya halus, kulitnya tipis tetapi keras (PPKKI, 2010). (Gambar 2.3)



Gambar 2.3 Kulit buah kakao (Sumber: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2015)

2.2.4 Kandungan Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

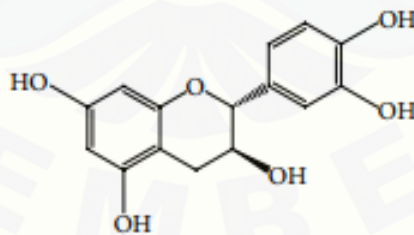
Buah kakao segar terdiri dari 75,52% kulit buah, 2,20% plasenta, dan 22,28% biji. Kulit buah kakao memiliki komposisi kimia seperti yang terlihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kulit Buah Kakao

Komponen	Presentase
Air	12,98
Total N	35,52
Protein	9,65
Lemak	0,15
Serat kasar	33,90
Abu	10,80

Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif alkaloid yaitu theobromin. Penggunaan limbah kakao sebagai pakan ternak memiliki batasan. Hal ini dikarenakan theobromin memiliki efek sebagai obat penenang (Helmestein, 2010). Senyawa alkaloid adalah senyawa organik yang memiliki atom nitrogen dan bersifat basa. Alkaloid dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui koagulasi protein sel bakteri. Koagulasi protein akan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, dan kemudian menyebabkan kematian sel bakteri (Mulyatni *et al.*, 2012).

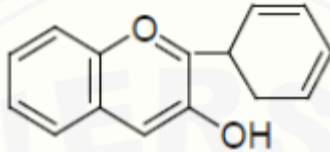
Kulit buah kakao mengandung campuran flavonoid atau tannin terkondensasi atau terpolimerisasi, berupa katekin, antosianin, leukoantosianidin yang kadang-kadang terikat dengan glukosa. Flavonoid pada kulit buah kakao termasuk golongan senyawa fenolik yang mempunyai ikatan glikosida. Senyawa fenolik akan berinteraksi dengan protein membran sel bakteri, kemudian masuk kedalam membran sel dan menyebabkan presipitasi protein sel. Proses ini menyebabkan permeabilitas membran sel terganggu sehingga mengalami lisis (Mulyatni *et al.*, 2012). Menurut Wollgast dan Anklam (2000) dalam Porbowaseso (2005), mengklasifikasikan polifenol kakao dalam tiga kelompok yaitu katekin (flavan-3-ols) 37%, antosianin 4% dan proantosianidin 58%.



Gambar 2.4 Struktur kimia katekin (Sumber: Ackar *et al.*, 2013).

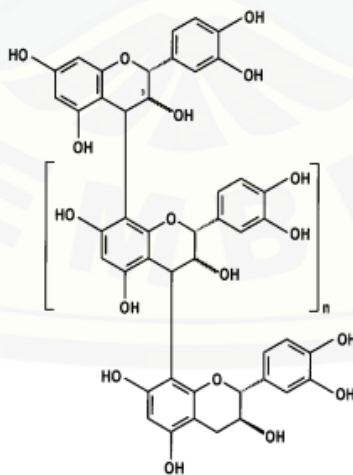
Katekin biasanya disebut juga asam *catechoat* dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$, tidak berwarna dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan *etil asetat*, hampir tidak larut

dalam *kloroform*, *benzene*, dan *eter* (Lestari, 2009). Katekin termasuk senyawa polifenol dari kelompok flavonoid. Flavonoid banyak ditemukan pada buah-buahan, daun teh, dan sayuran. Katekin juga memiliki banyak aktivitas biologi yang penting, seperti aktivitas antitumor dan antioksidan (Putri, 2010). (Gambar 2.4)



Gambar 2.5 Struktur kimia antosianin (Sumber: Robinson, 1995).

Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid dan merupakan kelompok terbesar pigmen alami pada tumbuhan yang larut dalam air yang bertanggung jawab untuk memberikan warna pada bunga, buah dan sayuran. Pigmen ini bertanggung jawab terhadap timbulnya warna oranye, jingga, merah, ungu, dan biru pada beberapa daun, bunga dan buah. Antosianin dapat juga bermanfaat bagi kesehatan sebagai sumber antioksidan. Hal ini disebabkan senyawa polifenolik ini merupakan glikosida turunan polihidroksi dan polimetoksi dari 2-phenilbenzopiriliumat atau garam flavilium (Lestario, 2011; Maulid dan Laily, 2015). (Gambar 2.5)



Gambar 2.6 Struktur kimia Proantosianidin (Sumber: Nakamura *et al.*, 2003).

Proantosianidin juga dikenal sebagai tanin terkondensasi, merupakan polimerisasi dari flavan-3-ol. Senyawa aktif ini memiliki keuntungan bagi kesehatan manusia seperti immunomodulator, antikanker, antioksidan, dan antiinflamasi (He *et al.*, 2008). (Gambar 2.6)

2.3 Periodontal Dressing yang Mengandung Ekstrak Kulit buah Kakao

Kandungan ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan persentase 5%, 10%, dan 15% pada *periodontal dressing* dapat mempercepat proses penyembuhan luka yang ditandai dengan proliferasi jumlah sel fibroblas pada kelinci. Proliferasi jumlah sel fibroblas yang diamati berasal dari penyembuhan luka dari perlukaan gingival kelinci yang dibuat dengan menggunakan *punch biopsy* 2.0 mm (Nurkesuma, 2014).

Proliferasi jumlah sel fibroblas lebih tinggi pada kelompok yang diberi *periodontal dressing* mengandung ekstrak kulit buah kakao meski kurang signifikan. Migrasi dan proliferasi sel fibroblas mulai berlangsung pada fase inflamasi yaitu pada 24 jam awal pasca luka. Migrasi dan proliferasi sel fibroblas ini diinduksi oleh faktor pertumbuhan terutama PDGF dan TGF- β serta faktor sitokin yang dilepaskan oleh trombosit dan leukosit. Dalam hal ini katekin, tannin, dan antosianin yang merupakan kandungan ekstrak kulit buah kakao mampu menekan jumlah sel radang dan radikal bebas yang dihasilkan selama fase inflamasi. Migrasi fibroblas ke jaringan luka yang diiringi dengan aktifitas fibroblas dalam mensintesis serat kolagen menjadi lebih progresif serta transformasi sel fibroblas menjadi miofibroblas terjadi lebih cepat pada penelitian ini. Hal ini disebabkan oleh katekin, tannin dan antosianin yang terkandung dalam ekstrak kulit buah kakao dalam *periodontal dressing*. Adanya katekin, tannin terkondensasi, dan antosianin memberi pengaruh antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan (Nurkesuma, 2014).

Kulit buah kakao mengandung flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antiinflamasi. Flavonoid menghambat pelepasan asam arachidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel netrofil dan sel endotelial. Konsentrasi tinggi dari beberapa senyawa

flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arachidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan jalan memblok jalur siklooksigenase dan fosfolipase A2. Sedangkan pada konsentrasi rendah hanya memblok jalur siklooksigenase. Terhambatnya pelepasan asam arachidonat dari sel inflamasi akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arachidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipooksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, dan tromboksan (Sabir, 2003).

2.4 Biokompatibilitas

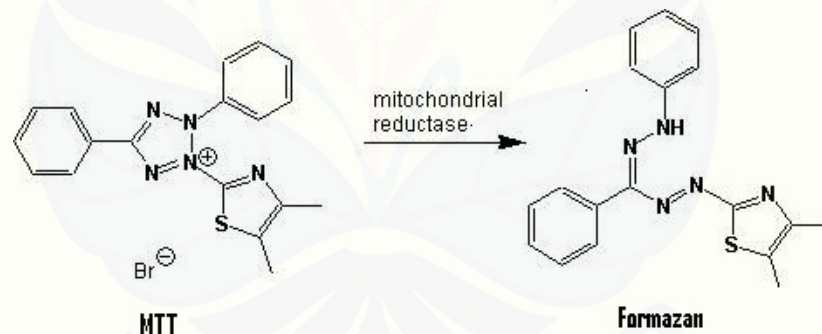
Biokompatibilitas dapat diartikan sebagai selaras dengan kehidupan dan tidak memiliki efek toksik atau efek merugikan yang diukur berdasarkan sitotoksitas lokal, respon sistemik, alergi dan karsinogenitas (Dorland, 1996). Tes biokompatibilitas diklasifikasikan dalam 3 tingkatan, yaitu :

- a. Uji primer merupakan uji toksisitas dari suatu bahan yang diletakkan secara langsung pada kultur sel atau di atas membran yang menutupi kultur sel.
- b. Uji sekunder (*secondary test*) ialah mengevaluasi berdasarkan potensi radang atau imunogenik termasuk didalamnya adalah uji toksisitas sistemik, uji toksisitas inhalasi, uji iritasi kulit, uji hipersensitivitas dan implantasi.
- c. Uji penggunaan pra-klinis yaitu bahan dievaluasi sesuai dengan pemakaian secara klinis (Anusavice, 2003).

2.5 Uji Sitotoksitas

Suatu bahan dalam kedokteran gigi sebelum digunakan secara klinis harus melalui berbagai pengujian antara lain uji sitotoksitas. Uji sitotoksitas juga merupakan salah satu tahap pengujian paling awal dan penting dilakukan terhadap suatu bahan yang akan dipakai di bidang kedokteran gigi. Tujuannya yaitu untuk mengetahui efek toksik suatu bahan (Siregar dan Hadijono, 2000).

Toksisitas merupakan kemampuan suatu zat untuk menimbulkan keracunan. Uji sitotoksisitas adalah suatu prosedur pengujian bahan terhadap jaringan untuk mengetahui efek toksik bahan tersebut. Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksisitas adalah metode perhitungan langsung (direct counting) dengan menggunakan pengecatan (trypan blue) dan metode MTT assay (Freshney, 2011). Metode yang umumnya digunakan untuk menilai toksisitas suatu bahan adalah dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT). Dasar Uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dan kultur sel. Uji ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup. Kelebihan uji MTT yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar. Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup (Khoswanto, 2008; Rahmarnda, 2014).



Gambar 2.7 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Sumber: Brescia, 2009)

MTT assay merupakan uji kolorimetri yang didasarkan atas pemecahan garam tetra zolium (MTT) yang berwarna kuning dan larut dalam air menjadi kristal ungu formazan yang tidak larut dalam air. Pemecahan MTT terjadi pada mitokondria sel yang hidup oleh enzim suksinat dehidrogenase (Gambar 2.7). MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi Formazan yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer*

Salline) berwarna ungu. Absorbansi yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel hidup. Kristal formazan yang terbentuk dapat diukur dengan menggunakan alat spektrofotometri (Hughes dan Mehmet, 2003; Mosman, 1983).

Tingkat toksisitas suatu bahan berdasarkan klasifikasi jumlah sel yang hidup yaitu:

- a. Sel yang hidup lebih dari 90% dapat diklasifikasikan sebagai tidak toksik.
- b. Sel yang hidup diantara 60% hingga 90% dapat diklasifikasikan sebagai sedikit toksik.
- c. Sel yang hidup diantara 30% hingga 59% dapat diklasifikasikan sebagai cukup toksik.
- d. Sel yang hidup kurang dari 30% dapat diklasifikasikan sebagai sangat toksik (Heravi *et al.*, 2013).

2.6 Kultur Sel

Mengkultur sel dapat diartikan menempatkan sel hidup ke dalam suatu media yang dapat menghantarkannya untuk berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro*. Bahan-bahan dalam bidang kedokteran gigi, sebelum dipasarkan harus melalui berbagai macam pengujian yang diantaranya adalah uji sitotoksitas yang kesemuanya menggunakan teknik kultur sel (Ma'at, 2011).

Berdasarkan sumber bahan yang dikultur dan metode kultur yang digunakan, kultur sel dibagi menjadi beberapa macam, yaitu :

- a. Kultur primer (*primary culture*)

Kultur sel yang berasal langsung dari organisme asalnya. Bahan kultur diambil secara langsung dari hewan atau manusia, dapat berupa organ, jaringan maupun sel. Umumnya kultur primer berumur pendek, yaitu hanya dapat dilakukan subkultur beberapa kali saja, sesudah itu akan mati.

b. Kultur sel diploid (*Diploid cell culture*)

Kultur dari sel-sel diploid yang berasal dari hasil kultur primer dan dapat dilakukan subkultur sampai sebanyak 50-70 kali. Umumnya akan mati setelah mencapai subkultur 50-70 kali.

c. Kultur cell lines atau sel kontinyu (*continuous cell culture*)

Kultur yang didapat dari sel-sel yang telah mengalami transformasi atau yang berasal dari sel neoplasma, umumnya dapat dilakukan subkultur sampai tidak terbatas. *Cell lines* yang banyak digunakan adalah sel L-929 yang berasal dari fibroblas paru-paru tikus, sel BHK-21 yang berasal dari fibroblas ginjal hamster (Ma'at, 2011).

2.7 Sel Fibroblas

Sel fibroblas merupakan sel yang paling banyak ditemukan pada jaringan ikat. Fibroblas berperan dalam pembentukan komponen matriks ekstraseluler jaringan ikat seperti sintesis kolagen, elastin, glikosaminoglikan, proteoglikan, dan glikoprotein multiadhesif. Fibroblas juga terlibat dalam produksi faktor pertumbuhan yang mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Pada orang dewasa, fibroblas dalam jaringan ikat jarang membelah, tetapi mitosis akan tampak jika diperlukan tambahan fibroblas misalnya ketika jaringan ikat cedera (Junqueira *et al.*, 1997).

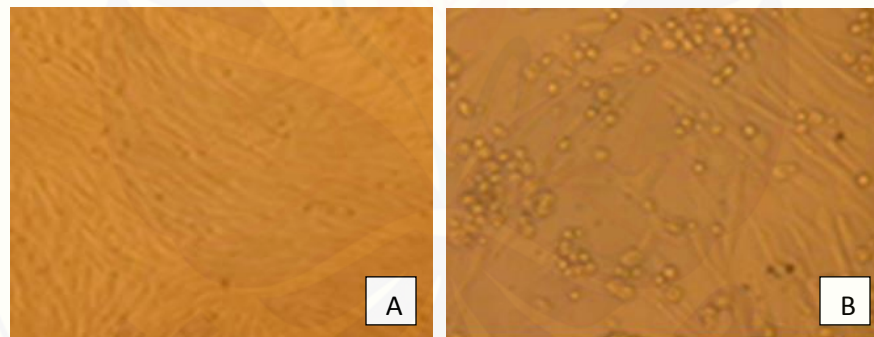
Sel fibroblas memiliki dua tahap aktivitas yaitu aktif dan inaktif. Pada tahap aktif, sel fibroblas berperan dalam proses remodeling atau perbaikan dan penyembuhan jaringan yang cedera. Sedangkan sel fibroblas inaktif yang disebut fibrosit, berada pada jaringan sehat/normal (Mescher, 2013).

Fibroblas aktif merupakan sel besar, memiliki cabang-cabang sitoplasma yang tidak teratur, intinya berbentuk lonjong, dan memiliki inti yang menonjol. Sitoplasmanya bersifat basofilik, banyak mengandung retikulum endoplasma kasar dan kompleks golgi yang berkembang baik. Sedangkan fibroblas inaktif atau fibrosit merupakan sel yang lebih kecil daripada fibroblas aktif dan cenderung berbentuk kumparan. Fibrosit memiliki gambaran pipih, cabang-cabangnya sedikit, inti lebih

kecil, gelap, dan panjang serta sitoplasmanya sedikit. Sitoplasmanya bersifat asidofilik, mengandung sedikit retikulum endoplasma kasar (Mescher, 2013; Junqueira *et al.*, 1997).

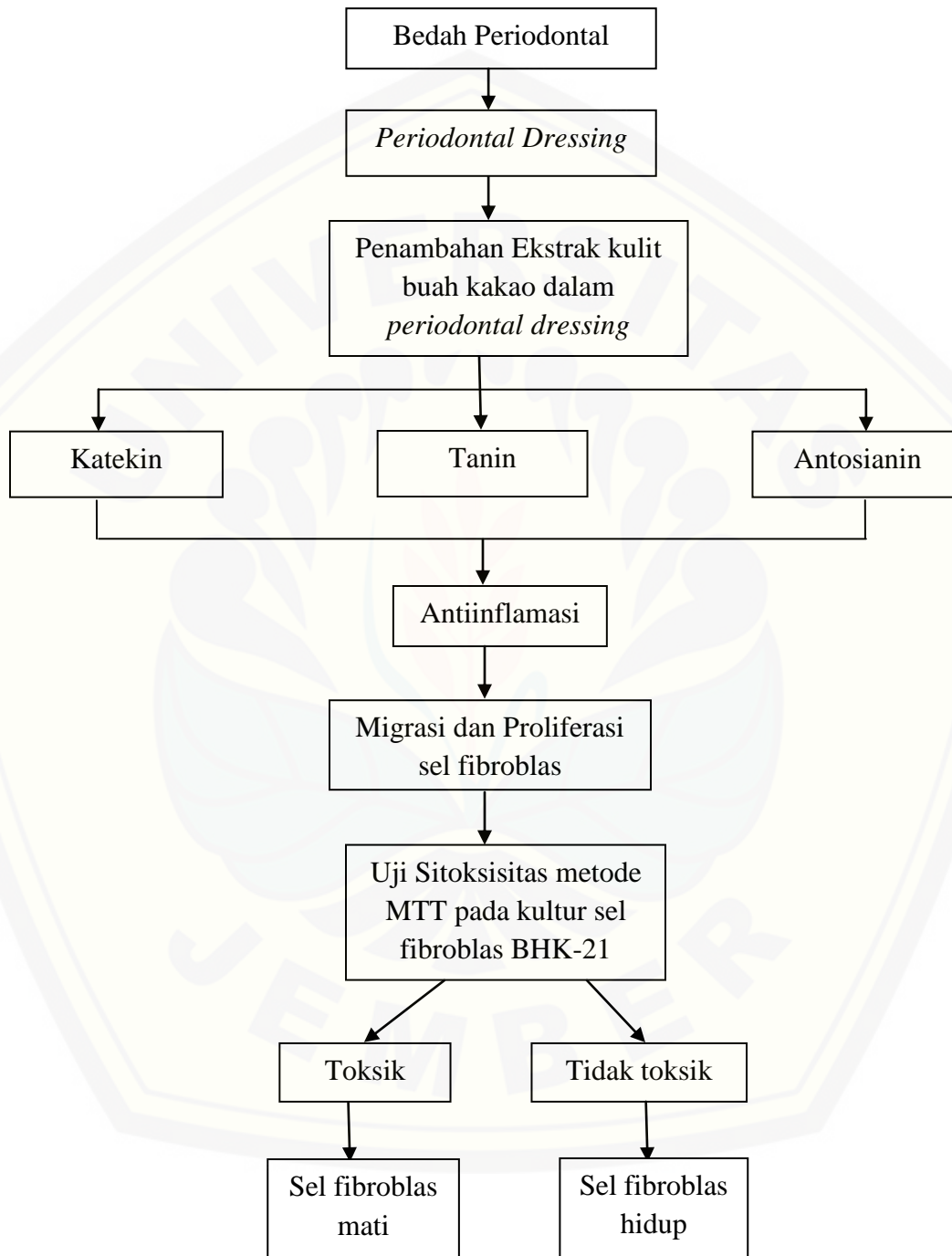
2.8 Sel Fibroblas BHK-21

Dua jenis sel yang digunakan untuk uji toksisitas dalam kultur sel adalah L-929 yang berasal dari fibroblas paru-paru tikus dan sel BHK-21 yang berasal dari fibroblas ginjal hamster. Sel fibroblas BHK-21 dikembangkan oleh Macpherson dan *MGP Stoker* pada Maret 1961 (Ma'at, 2011). Sel BHK-21 lebih banyak digunakan untuk menguji sitotoksisitas dari bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi karena mudah tumbuh dan mudah di sub kultur. Kultur sel terbaik berasal dari sel embrionik atau sel jaringan muda. Kultur sel ini memiliki kemiripan struktur dengan sel fibroblas manusia yang banyak ditemukan di rongga mulut (Gunawan *et al.*, 2014; Nirwana, 2005).



Gambar 2.8 Gambaran mikroskopis pada sel fibroblas BHK-21 normal (A); Gambaran sel fibroblas BHK-21 yang mengalami efek sitopatik dengan karakteristik sel berbentuk bulat (B) (Sumber: Minakshi *et al.*, 2014).

2.9 Kerangka Konsep



2.10 Penjelasan Kerangka Konsep

Bedah periodontal merupakan salah satu perawatan dalam kedokteran gigi untuk menghilangkan penyakit periodontal. Pada kebanyakan kasus, setelah dilakukan prosedur bedah *periodontal* maka dibutuhkan *periodontal dressing* untuk menutup luka. *Periodontal dressing* berfungsi mengurangi kemungkinan terjadinya infeksi dan pendarahan pasca bedah, membantu penyembuhan dengan jalan melindungi luka bedah dari trauma sewaktu pengunyahan, mencegah timbulnya nyeri sakit yang dipicu oleh berkontakannya luka bedah dengan makanan atau lidah sewaktu pengunyahan. *Periodontal dressing* yang ada saat ini tidak mengandung bahan yang dapat mempercepat penyembuhan luka (Newman *et al.*, 2015). Maka dari itu diperlukan penambahan bahan yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka tanpa menimbulkan efek samping. Penambahan ekstrak kulit buah kakao 15% terbukti dapat mempercepat penyembuhan luka, karena kandungannya seperti katekin, tannin, dan antosianin. Senyawa aktif tersebut dapat berfungsi sebagai antiinflamasi sehingga proses migrasi dan proliferasi sel fibroblas dalam penyembuhan luka meningkat (Nurkesuma *et al.*, 2014). Setiap bahan yang telah diujikan secara *in vivo* pada hewan, harus diuji biokompatibilitasnya terlebih dahulu sebelum diaplikasikan pada manusia. Penentuan biokompatibilitas dapat diketahui melalui uji sitotoksisitas dengan menggunakan metode MTT. Bahan diujikan pada kultur sel fibroblas BHK-21. Apabila bahan bersifat toksik maka sel fibroblast akan mati, akan tetapi apabila bahan bersifat tidak toksik maka sel fibroblas akan tetap hidup (Khoswanto *et al.*, 2008).

2.11 Hipotesis

Periodontal dressing yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% tidak memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* (Notoadmojo, 2010).

3.2 Tempat dan waktu penelitian

3.2.1 Tempat penelitian

Uji sitotoksitas dilakukan di Laboratorium PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Pembuatan ekstrak kulit buah kakao dan *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% dilakukan di Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2017

3.3 Identifikasi Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Saliva hasil perendaman *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15%

3.3.2 Variabel Terikat

Kultur Sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21).

3.3.3 Variabel terkontrol

- a. Kulit buah kakao
- b. Persentase kadar ekstrak kulit buah kakao pada *periodontal dressing*
- c. Komposisi bahan *periodontal dressing*
- d. Media pertumbuhan sel fibroblas (*Eagle*)
- e. Kultur *cell lines* BHK-21

- f. Suhu inkubasi uji sitotoksisitas (37° C) dan suasana CO₂ 5%
- g. Waktu pengamatan (24 jam)

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Ekstrak Kulit Buah Kakao

Ekstrak kulit buah kakao adalah bahan yang merupakan hasil ekstraksi dari kulit segar buah kakao yang diperoleh dari PT Perkebunan Nusantara XII Jember. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah aseton 70% dalam suhu ruang.

3.4.2 *Periodontal Dressing*

Periodontal dressing adalah bahan yang diaplikasikan setelah melakukan bedah periodontal dengan tujuan melindungi daerah luka, memberi rasa nyaman, membantu mempertahankan bentuk flap, dan mengurangi perdarahan. *Periodontal dressing* formula Baer terdiri dari powder dan pasta. Komposisi powder *dressing* terdiri dari rosin 57% dan *zinc oxide* 43% yang dicampur sampai homogen. Sedangkan komposisi pasta *dressing* terdiri dari *hydrogenated fat* 95% dan *zinc oxide* 5% yang dicampur sampai homogen. Powder dan pasta kemudian dicampur dengan perbandingan 1:1 sampai homogen.

3.4.3 Sel fibroblas

Sel fibroblas adalah sel yang secara mikroskopis terlihat memiliki proses sitoplasmik yang panjang apabila sel tersebut hidup, jika gambaran mikroskopis menunjukkan sel berbentuk bulat maka sel dikatakan mati. Sel didapatkan dari Laboratorium PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya.

3.4.4 Uji Sitotoksisitas

Uji Sitotoksisitas adalah uji yang dilakukan untuk melihat sifat toksik suatu bahan terhadap sel yang ditentukan melalui viabilitas sel fibroblas BHK-21 terhadap *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15%, dihitung memakai metode MTT assay dengan menggunakan ELISA reader (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 620 nm. Pada sel yang hidup akan terbentuk gambaran ungu formazan.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu

Kelompok 1: Saliva steril (kontrol negatif)

Kelompok 2: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Coe-Pak (kontrol positif)

Kelompok 3: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Formula Baer tanpa ekstrak kulit buah kakao 15%

Kelompok 4: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Formula Baer yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15%

3.5.2 Jumlah sampel Penelitian

Penentuan besar sampel untuk setiap kelompok perlakuan dipilih secara random dan perhitungan besar sampel memakai rumus (Steel dan Torrie, 1995):

$$n = \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \sigma p^2}{\delta^2} \right)$$

Keterangan :

n : Besar sampel minimal

Z_{α} : Batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas atas kemaknaan (1,96)

Z_{β} : Batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas bawah kemaknaan (0,85)

Pada penelitian eksperimental $\sigma p^2 / \delta^2 = 1$

Perhitungan :

$$n = \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \sigma p^2}{\delta^2} \right)$$

$$n = (1,96 + 0,85)^2 = 7.8961$$

Dari hasil penghitungan menggunakan rumus diatas diperoleh jumlah minimal sampel untuk tiap kelompok perlakuan sebesar delapan.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Pisau *stainless steel*, Nampan, Toples kaca bertutup, *Juicer* (Kirin, Indonesia), Timbangan digital (Boeco, Jerman), *Beaker glass* (Pyrex, Japan), *Hot stirrer plate*, Agate spatula, Spatula stainless steel, *glass plate*, Gelas ukur (Pyrex, Japan), Corong kaca (Herma, Japan), Gelas takaran (Kirapak, Indonesia), Oven (Mettler GmbH + Co. KG, tipe 300, Germany), *Rotary evaporator* (Heidolph, Laborota 4000, German), Gelas kimia 500 ml (Pyrex), Spatula pengaduk, Milipore Filter, Syringe 5ml, tabung eppendorf, *valcon tube*, *well plate-24*, kotak *Styrofoam*, *96-well tissue culture plate* (Nunc, USA), *Elisa reader* (Thermo Scientific, USA), *Automatic plate shaker* (Vari shaker, USA), Inkubator (Mettler, Germany), *Micropipette* (Eppendorf, Germany), Botol kultur (Roux, Schott Duran, Germany), *Microscope inverted* (Nikon, Jepang), *Multi channel pipette* (ICN, Germany), *Laminar flow hood* (Clemco, Australia), *Sterile pipette tips* (Eppendorf, North America), Tabung steril (Pyrex, USA), Spuit (Sterra, Indonesia), *Biosafety cabinet* (Clemco, Australia).

3.6.2 Bahan Penelitian

Kulit buah kakao varietas Sulawesi I, Aseton 70%, Aquades 1000ml, Alkohol 70%, Rosin, *Zinc oxide*, *Hydrogenated fat*, *Periodontal dressing* Coe-pak, saliva steril, aquabides 50 ml, *dry ice*, Kultur sel: *Cell line BHK-21*, Antibiotika: Penisilin streptomisin (penstrep) 1%, Antifungi: *fungizone 100 unit/ml*, Fetal bovine serum (FBS) 10% , Media *Eagle*, Pencuci serum: *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT), *Dimethylsulfoxide* (DMSO)

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dan logam, dicuci bersih kemudian disterilkan dengan *dry heat oven* selama 15 menit dengan suhu 110°C sedangkan semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih, dikeringkan kemudian diulas alkohol 70%.

b. Uji Identifikasi Buah Kakao

Buah Kakao yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi untuk mengetahui bahwa buah kakao yang digunakan berasal dari spesies *Theobroma cacao L.* Uji identifikasi ini dilakukan di UPT Materia Medica Batu. Buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang digunakan berasal varietas Sulawesi I dengan usia panen 5 bulan. Kulit buah kakao yang digunakan adalah semua bagian kulit segar.

3.7.2 Tahap Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao l.*)

Kulit segar buah kakao (*Theobroma cacao L.*) diblender hingga halus. Sampel kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dimaserasi menggunakan pelarut aseton : aquades (7:3), dengan perbandingan sampel : pelarut (1:2) sambil diaduk kemudian disaring. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali (remaserasi 3x). Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *Rotary evaporator* sampai pelarut tidak tersisa dan diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair dipekatkan dengan *oven* pada suhu 60°C (Sartini *et al.*, 2009).

3.7.3 Tahap Pembuatan Saliva

Saliva diambil dari responden dengan nilai Indeks OHI-S baik, tidak mengkonsumsi obat-obatan, tidak memiliki penyakit sistemik, tidak merokok dan tidak makan 2 jam sebelum pengambilan sampel. Saliva dikeluarkan tanpa rangsangan, dikumpulkan dalam *beaker glass* sebanyak 20 ml, kemudian dilakukan

sentrifugasi selama 20 menit pada 2000 rpm untuk mendapatkan supernatan. Sterilisasi saliva dilakukan dengan menyaring saliva menggunakan *filter unit Miliphore* yang dipasang pada tempat jarum syringe. Saliva steril dimasukkan dalam *valcon tube* (Ratnasari *et al.*, 2013).

3.7.4 Tahap Pembuatan *Periodontal Dressing* Coe-Pak

Periodontal dressing Coe-Pak terdiri dari 2 pasta yaitu pasta basis dan pasta akselerator. Coe-Pak didapatkan dengan mencampur pasta basis dan pasta akselerator sama panjang, yang diaduk sampai didapatkan warna yang merata. Setelah 2-3 menit pasta yang telah diaduk sudah dapat dibentuk (Newman *et al.*, 2015). *Periodontal dressing* Coe-Pak digunakan sebagai kontrol positif.

3.7.5 Tahap Pembuatan *Periodontal Dressing*

Pembuatan *powder* : tuangkan rosin sebanyak 2,85 gram dan *zinc oxide* sebanyak 2,15 gram. Campur rosin dan *zinc oxide* sampai homogen. Pembuatan pasta : tuangkan 4,75 gram *hydrogenated fat* dan 0,25 gram *zinc oxide* kemudian campur sampai homogen. Selanjutnya campur *powder* 5 gram dan pasta 5 gram sedikit demi sedikit sampai homogen (Pradita *et al.*, 2013).

3.7.6 Tahap Pembuatan *Periodontal Dressing* yang ditambahkan Ekstrak Kulit Buah Kakao 15%

Formula *periodontal dressing* yang sudah homogen diambil 2,55 gram, kemudian ditambahkan ekstrak kulit buah kakao sebanyak 0,45 gram. *Periodontal dressing* yang dicampur dengan ekstrak kulit buah kakao digunakan sebagai kelompok perlakuan (Nurkesuma, 2014).

3.7.7 Tahap Perendaman *Periodontal Dressing* dalam Saliva

Saliva steril dipindahkan kedalam well sebanyak 2 ml untuk masing masing kelompok. *Periodontal dressing* yang telah dibuat direndam dalam saliva steril

selama 7 hari pada suhu 37°C. Hasil rendaman selama 7 hari kemudian di saring menggunakan milipore filter dan disimpan dalam tabung eppendorf, lalu dibawa ke PUSVETMA untuk dilakukan uji sitotoksitas (Kusumawardhany, 2014).

3.7.8 Tahap Uji Sitotoksitas

1. Tahap persiapan sel fibroblas BHK-21

Sel fibroblas diambil dari kultur sel BHK-21 dalam bentuk cell-line yang ditanam dalam botol Roux. Setelah penuh, kultur dipanen dengan menggunakan larutan *Trypsine Versene*. Hasil panen ditanam dalam media *Eagle* yang mengandung 5% fetal bovine serum albumin, kemudian dipindahkan dalam setiap sumur *microplate 96 well* sampai konfluen. Setiap sumur berisi sel dan media *Eagle* dengan kepadatan 2×10^5 sel/ml sebanyak 100µl, setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. (Rahmarnda *et al.*, 2014).

2. Tahap Persiapan uji sitotoksitas

Mengamati *microplate* yang berisi sel fibroblas yang telah diinkubasi di bawah mikroskop cahaya, apakah sel fibroblas yang telah ditanam dalam setiap *well* telah cukup banyak untuk dilakukan perlakuan (Rahmarnda *et al.*, 2014).

3. Tahap Perlakuan

Siapkan *microplate* (96 *well*/sumuran), kemudian sel fibroblas dengan kepadatan 2×10^5 dalam 100 µl media kultur (*Eagle*, penstrep 1%, PBS 10%, fungizone 100 unit/ml), dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran. Untuk prosedur uji MTT, ada 4 kelompok yaitu :

- Kelompok 1: Saliva steril (kontrol negatif)
- Kelompok 2: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Coe-Pak (kontrol positif)
- Kelompok 3: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Formula Baer tanpa ekstrak kulit buah kakao 15%

- Kelompok 4: Saliva hasil rendaman *periodontal dressing* Formula Baer yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15%

Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C. Keluarkan *microplate* (96 well/sumuran) dari inkubator (Khoswanto, 2008).

4. Tahap Pengamatan dan Pembacaan Hasil Perlakuan

Garam Tetrazolium (MTT) dilarutkan dalam PBS 5mg/ml. MTT ditambahkan secara langsung pada plate yang berisi media kultur sebanyak 10µl , kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C. Kedalam suspensi sel ditambahkan larutan DMSO (*Dimethylsulfoxide*) sebanyak 50 µl tiap sumuran. *Plate* diaduk secara mekanis dengan *Plate Shaker* sampai kristal formazan terlarut, selama 5 menit. Sel fibroblas yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi ungu sedang yang mati tidak terbentuk warna ungu. Selanjutnya, formazan dibaca absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA reader pada panjang gelombang 620 nm (Rahmarnda *et al.*, 2014).

Hitung rata-rata persentase kehidupan sel dari nilai Optical density (absorbansi) masing-masing sampel pada setiap konsentrasi terhadap nilai kontrol. Buat grafik persentase kehidupan sel terhadap kelompok perlakuan dan kontrol. Persentase kehidupan sel dihitung menggunakan rumus yang digunakan oleh Christian Khoswanto (UNAIR, 2008) sebagai berikut:

Rumus :

$$\% \text{ kehidupan sel} = \frac{\text{Grup tes+media}}{\text{sel+media}} \times 100\%$$

Keterangan :

- % kehidupan sel: persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji
- Grup tes: Nilai OD (Optical Density) formazan setiap sampel setelah tes
- Media: Nilai OD (Optical Density) formazan pada rata-rata setiap kontrol media
- Sel: Nilai OD (Optical Density) formazan pada rata-rata kontrol sel

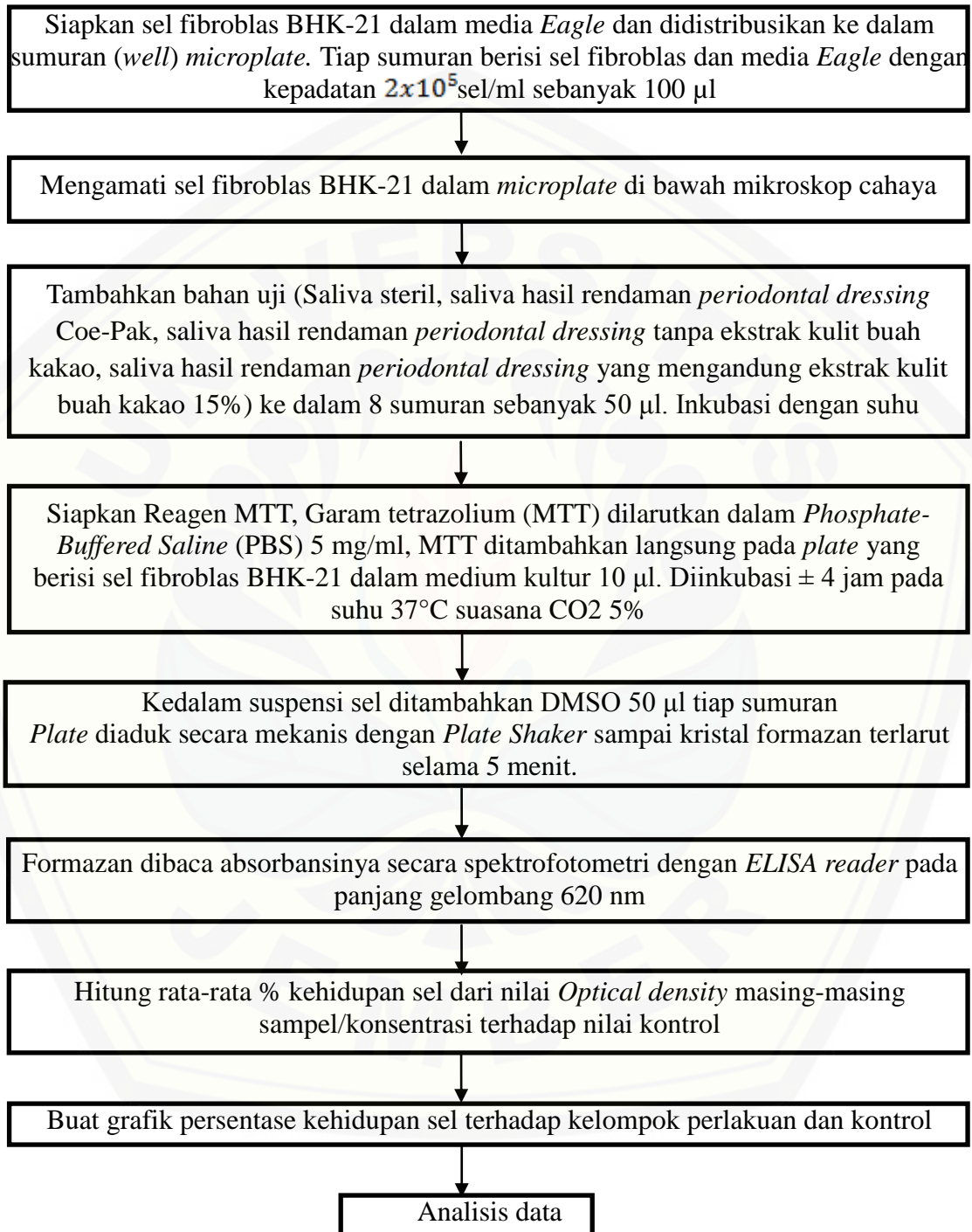
Tingkat toksisitas suatu bahan menurut klasifikasi jumlah sel yang hidup dikelompokkan menjadi :

- Sel yang hidup lebih dari 90% dapat diklasifikasikan sebagai tidak- toksik.
- Sel yang hidup diantara 60% hingga 90% dapat diklasifikasikan sebagai sedikit toksik.
- Sel yang hidup diantara 30% hingga 59% dapat diklasifikasikan sebagai cukup toksik.
- Sel yang hidup kurang dari 30% dapat diklasifikasikan sebagai sangat toksik (Heravi *et al.*, 2013).

3.7.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Kemudian dilanjutkan dengan uji statistik parametrik, yaitu Uji *One-way ANOVA* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Setelah itu dilakukan uji lanjut dengan LSD (*Least Square Differences*) untuk melihat perbedaan sitotoksitas terhadap pertumbuhan sel fibroblas (*BHK-21*) antar semua kelompok perlakuan.

3.7.10 Alur Penelitian Uji Sitotoksitas



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *periodontal dressing* yang mengandung ekstrak kulit buah kakao 15% tidak memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel fibroblas *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21).

5.2 Saran

Saran-saran yang diberikan dari penelitian ini :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang penambahan ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) pada *periodontal dressing* dengan persentase penambahan yang berbeda untuk mengetahui *lethal concentration* bahan tambahan ini.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui biokompabilitas *periodontal dressing* dengan penambahan ekstrak kulit buah kakao 15% secara *in vivo*

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, D.P., Francis, J.A., Schutzki, R.E., Chandra, A., Nair, M.G. 2005. "Quantification and Characterisation of Cyclo-oxygenase and Lipid Peroxidation Inhibitory Anthocyanins in Fruits of Amelanchier". *Phytochem Anal.* Vol. 16(1):175-80.
- Ackar, Lendic, Valek, Subaric, Milicevic, Babic, dan Nedic. 2013. "Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food?". *Journal of Chemistry*
- Aldea, E., M. Giurginca, F. Miculescu, I. Demetrescu. 2007. Infrared and ESEM Technique in Supporting Ti and Ti-AL-V Alloy Behaviour in Afnor and Tani-Zucchi Solutions. *Journal of Optoelectronics and Advanced Material.* Vol 9(11): 3393-3396.
- Anusavice KJ. *Phillips buku ajar ilmu bahan kedokteran gigi.* Ed. 10. Alih Bahasa oleh Budiman J, Purwoko S. 2003. Jakarta: EGC.
- Ardiana, T., Kusuma, A., dan Firdausy, M., 2015. "Efektivitas Pemberian Gel Binahong (*anredera cordifolia*) 5% terhadap Jumlah Sel fibroblast pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Marmut (*Cavia Cobaya*)". *ODONTO Dental Journal.* Vol. 2(1).
- Baghani, Z. dan Kadkhodazadeh, M. 2013. "Periodontal Dressing: A review Article". *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospect.* Vol. 7(4):183-191
- Brescia, P., Banks, P., dan Biotek Instruments. 2009. *Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch Microplate Spectrophotometer.* USA: Biotek Instruments.
- Butt, S.M. and Sultan, M.T. 2009. "Green Tea Natures Defense Against Malignancies. National Institute of Food Science and Technology". *University of agriculture.* Vol. 49.
- Celis, Julio. 2006. *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* Edisi 3. USA: Elsevier Academic Press
- Corti, Flammer, Hollenberg, dan Luscher. 2009. "Cocoa and Cardiovascular Health". Dallas: American Heart Association.
- David K., Nneetha, S., Swati, P. 2013. "Periodontal Dressings: An Informed View". *J Pharm Biomed Sci,* 26(26): 269-272.

- Dorland. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. Edisi 25. Alih bahasa oleh dr. Poppy Kumala, dr. Sugiarto Komala, dr. Alexander H. Santoso, dr. Johannes Rubijanto Sulaiman, dr. Yuliasari Rienita. 1998. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Dziedzic, Kubina, Kabala-Dzik, Wojtyczka, Morawiec, dan Buldak. 2014. "Caffeic Acid Reduces the Viability and Migration Rate of Oral Carcinoma Cells (SCC-25) Exposed to Low Concentration of Ethanol". *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 18725-18741.
- Figuera, A., Janick, J., dan BeMiller, J., N. 1993. *New Products from Theobroma cacao: Seed pulp and pod gum*. New York: New crops.
- Fitriana. 2012. *Analisis Tingkat Kekerasan Gigi Pada Simulasi Karies Gigi Dengan Inhibisi Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.)*. Skripsi. Jember: fakultas kedokteran gigi Universitas Jember
- Freshney, R. I. 2011. *Animalcell Culture, A practical approach 6th edition*. IRL Press: Washington DC.
- Gunawan, C. K., Mulawarmanti, D., Laihad F. M. 2014. Sitotoksitas Ekstrak Daun *Avicennia marina* terhadap Sel Fibroblas. *Jurnal Kedokteran Gigi Hang Tuah*. Vol. 8 (2).
- Hayyu, N., Endah, A., dan Djamhari, M. 2013. "Cytotoxicity of *Garcinia mangostana* Linn pericarp extract toward human gingival fibroblast cell." *Oral Medicine Dental Journal*, 4(1): 10-16.
- Heravi, Ramezani, Poosti, Hosseini, Shajiei, dan Ahrari. 2013. "In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium – dioxide Nano – particles". *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. 7(4), 192-198.
- Hee, F., Pan, Q., Shi, Y., dan Duan, C. 2008. "Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants". *Molecules*. 13: 2674-2703.
- Hii, Lawi, Suzannah, Misnawi, dan Clokei. 2009. Polyphenol in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Argo Industry*. Vol. 2(4):702-722.
- Hughes, D., dan Mehmet, H. 2003. *Cell Proliferation and Apoptosis*. Oxford: Bios Scientific Publisher.
- Ide, P. 2008. *Dark Chocolate Healing Mengungkap Kasiat Coklat terhadap Sirkulasi Darah dan Imunitas Tubuh*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.

- Izzudin, A. & Nurkesuma A. 2015. "The Potential Of Cocoa (*Theobroma Cacao L.*) Pods Extract In *Periodontal Dressing* To Rabbit Gingival Wound Healing". *Scientific Cooperations Medical Workshops*.
- Jeffers, M. 2006. "Tannin as Anti-Inflammatory Agent". Tesis. Miami University Oxford, Ohio.
- Junqueira, C.L., dan Carneiro, J. *Histologi Dasar Teks dan Atlas Ed. 8*. Alih Bahasa oleh dr. Jan Tambayong. 1997. Jakarta: EGC.
- Karmawati, Syakir, Munarso, Ardana, dan Rubiyo. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kakao*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
- Kathariya, R., Jain, H., dan Jadhav, T. 2015. "To pack or not pack: the current status of *periodontal dressings*". *J. Appl Biomater Funct Mater*, 13(2):e73-e86.
- Kale, T., Dani, N., dan Patange, T. 2014. "*Periodontal Dressing*". *Journal of Dental and Medical Sciences*. Vol. 13(3): 94-98
- Kayaputri, Sumanti, Djali, Indiarto, dan Dewi. 2014. "Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*)". *Chimica et Natura Acta*. Vol. 2(1):83-90
- Khoswanto, C., Arijani, E., dan Soesilawati, P. 2008. Cytotoxicity test of 40, 50 and 60% Citric Acid as Dentin Conditioner by using MTT Assay on Culture Cell line. *J.Dent* Vol.41 (3): 103-106.
- Kurnia, P., Ardhiyanto, H., dan Suhartini. 2015. "Potensi Ekstrak Teh Hijau (*Camellia Sinensis*) Terhadap Peningkatan Jumlah Selm Fibroblas Soket Pasca Pencabutan Gigi pada Tikus Wistar". *E-Journal Pustaka Kesehatan*, vol. 3(1)
- Kusumawardhany, Diera, F. 2014. *Efek Sitotoksik Penambahan Katekin Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) 20% pada *Periodontal Dressing* terhadap Human Primary Fibroblast*. Skripsi. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Lestari, C., Widjijono, Murdiastuti, K. 2009. "Pengaruh Ekstrak Gambir Terstandarisasi (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb) sebagai *Periodontal Dressing* terhadap Penyembuhan Luka Gingiva Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)". *Majalah Kedokteran Gigi* Vol. 16(1):8.
- Lestario, L. N., Rahayuni, E., Dan Timotius, K. H. 2011. "Kandungan Antosianin Dan Identifikasi Antosianidin Dari Kulit Buah Jenitri (*Elaeocarpus Angustifolius* Blume)". *Agritech*. Vol. 3 (2)
- Ma'at, S. 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Surabaya: Airlangga University press.

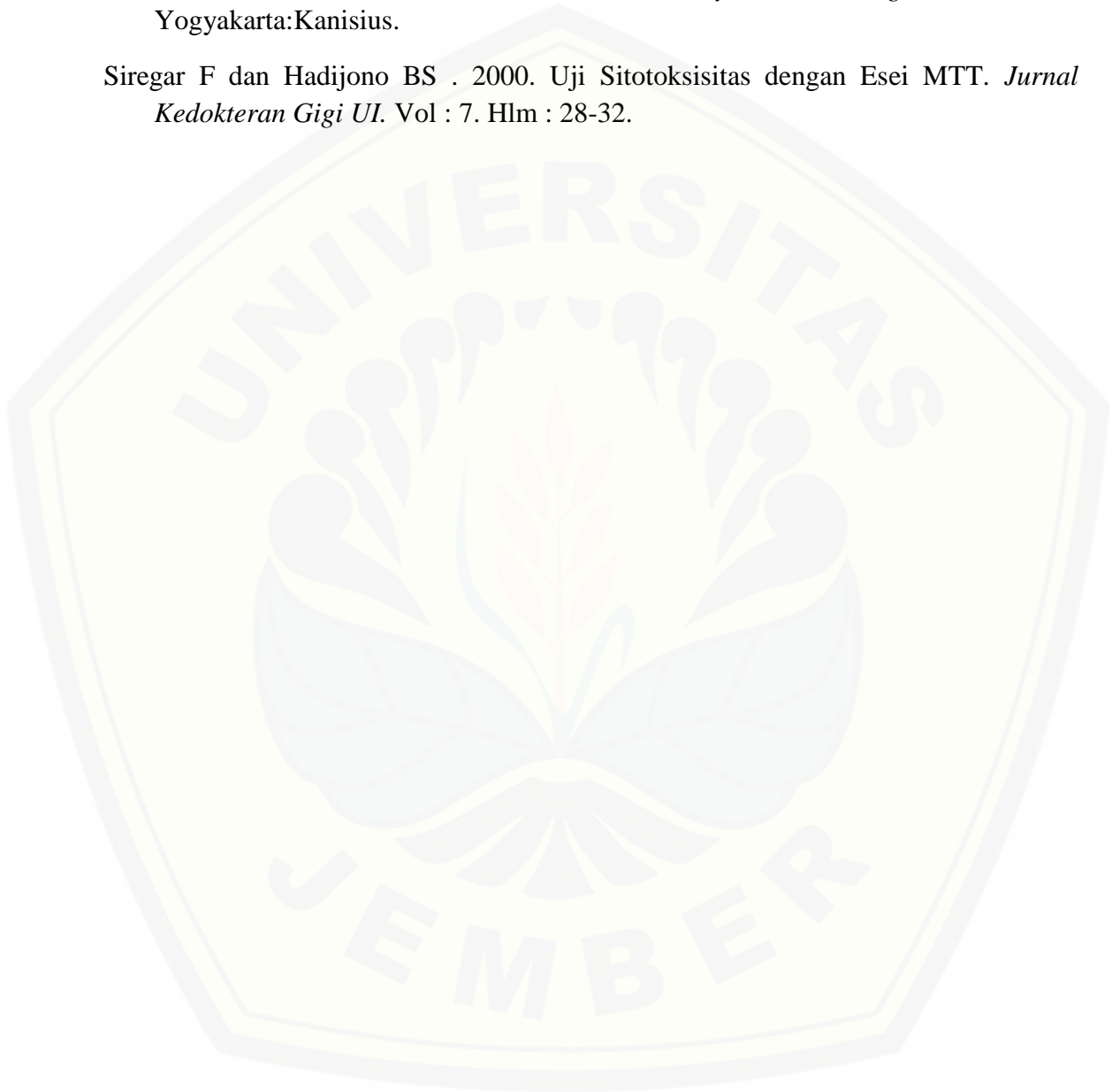
- Maulid, R. R., dan Laily, A. N. 2015. *Kadar Total Pigmen Klorofil dan Senyawa Antosianin Ekstrak Kastuba (Euphorbia pilcherrima) berdasarkan Umur Daun*. Malang: Universitas Islam Negri.
- Mescher, Anthony, L. 2013. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. 13th Ed. USA: McGraw-Hill Education.
- Minakshi, Ranjan, Brar, Ambawat, dan Shafiq. 2014. "New Approaches for Diagnosis of Viral Diseases in Animals". *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2 (4S): 55 – 63.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J Immunol Methods*. Vol. 65(1-2): 55-63.
- Mulyatni, A. S., Budiani, A., Taniwiryo, D., 2012. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) terhadap Escherichia coli, Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
- Murni, R., Akmal, dan Okrisandi, Y. 2012. "Pemanfaatan Kulit Buah Kakao yang Difermentasi dengan Kapang *Phanerochaete chrysosporium* Sebagai pengganti hijauan dalam ransum ternak kambing. *AGRINAK*. Vol.2(1).
- Nakamura, Y., Tsuji, S., dan Tonogai Y. 2003. "Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extract, Health Food and Grape Seed Oils". *Journal of Health Science*. 49(1): 45-54.
- Newman, Takei, Klokkevold, dan Carranza, F.A. 2015. *General Principles of Periodontal Surgery; Carranza's Clinical Periodontology*. 12th Ed. London, New York: PA.
- Nirwana, I.& Soekartono R. H. 2005. Sitotoksisitas Resin Akrilik Hybrid Setelah Penambahan Glass Fiber dengan Metode berbeda. *Majalah Kedokteran Gigi (Dent. J.)* Vol. 38 (2): 56-59.
- Notoadmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Nurkesuma, A., Harmono, H., dan Rochim, A. 2014. "Potensi Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam *Periodontal Dressing* terhadap Jumlah Sel Fibroblas Luka Gingiva Kelinci". Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Orrenius, S., Nicotera, P., Zhivotovsky, B. 2011. Cell Death Mechanism and Their Implication in Toxicology. *Toxicological Sciences* Vol: 119(1): 3-19.

- Porbowaseso, T. 2005. *Ekstraksi Polifenol Biji Kakao secara Kimiawi sebagai Antioksidan dan Pewarna Alami*. Jember: Universitas Jember Press.
- (PPKKI) Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. 2010. *Buku Pintar Budi Daya Kakao*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Pradita, Dhartono, Ramadhany, dan Taqvim. 2013. *Periodontal Dressing Containing Green Tea Eppigallocatechin gallate Increases Fibroblasts Number in Gingival Artificial Wound Model*. *Journal of Dentistry Indonesia*. Vol. 20 (3): 68-72.
- Prichard JF. 1972. *Advanced Periodontal Disease: surgical and prosthetic management*. 2nd Ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Rahmarnda, N. K., Munadzirah E., dan Soebagio. 2014. Uji Sitotoksitas Ekstrak Kulit dan Biji Buah Kelengkeng (*Euphoria Longana Lam.*) terhadap Sel Fibroblas dengan MTT Assay. *Material Dental Journal* Vol. 5 (1): 31-35.
- Ranneh, Y., Ali, F., dan Fadel, A., 2014. "The Antioxidant Activity of Cocoa Polyphenolic Extract-Treated 3T3 Fibroblast Cells". *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. Vol. 6(1): 14-19.
- Ratnasari, A., Widajati, W., Hendrijantini, N. 2013. Efek Seduhan Bunga Rosella dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida albicans* Pada Resin Akrilik. *Journal of Prosthodontics*. Vol. 4(1): 22-26.
- Robinson, T. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi 6. Alih bahasa oleh Kosasih Padmawinata. 1995. Bandung: ITB.
- Sabir, A. 2003. "Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi". *Majalah Kedokteran Gigi*. Vol. 36: 81-87.
- Sari, Mahriani, Tiningrum, Wahyudi, dan Misnawi. 2015. "Cocoa Extract Indicated has Activity on Selectively Killing Breast Cancer Cells". *The Journal of Tropical Life Science*. Vol. 5 (3): 128-132.
- Sartini, Djide, M. N., Alam, G. 2009. *Ekstraksi Komponen Bioaktif dari Limbah Kulit Buah Kakao dan Pengaruhnya Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba*. Makasar: Universitas Hasanudin.
- Schmalz, G. and Arenholt-Bindslev, D. 2009. *Biocompatibility of Dental Materials*. Berlin: Springer.

Siregar, T.H.S., Riyadi, S., Nuraeni, L. 2010. *Budi Daya Cokelat*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Susanto, FX. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Yogyakarta: Kanisius.

Siregar F dan Hadijono BS . 2000. Uji Sitotoksitas dengan Esei MTT. *Jurnal Kedokteran Gigi UI*. Vol : 7. Hlm : 28-32.



LAMPIRAN

A. Surat Keterangan

A.1 Surat Hasil Identifikasi Kulit Buah Kakao



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074/296/101.8/2016
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Coklat**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : VEDA CHANDRIKA ADNYANA
 NIM : 131610101071
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 UNIVERSITAS JEMBER

1. Perihal determinasi tanaman coklat
 - Kingdom : Plantae
 - Sub Kingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta
 - Divisi : Magnoliophyta
 - Sub divisi : Angiospermae
 - Kelas : Dicotyledonae
 - Bangsa : Malvales
 - Suku : Sterculiaceae
 - Marga : Theobroma
 - Jenis : *Theobroma cacao* L.
 - Nama Umum : Coklat, kakao.
 - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120b-128b-129b-135b-136b-139b-140b-142b-143a-144b-145b-1b-3b-4b-5b-6b.
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi 5-10 m. Batang: Berkayu, bulat, percabangan monopodial, coklat kotor. Daun: Tunggal, bertangkai, bulat telur, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 10-48 cm, lebar 4-20 cm, hijau. Bunga: Tunggal, di ketiak daun, berkelamin dua, kelopak putih panjang 6-8 mm, mahkota panjang 8-9 mm, benang sari bentuk periuk, stamodia ungu tua, ujung putih, bakal buah beruang lima, merah. Buah: Buni, bulat telur, berusuk, kulit buah tebal, panjang 12-22 cm, merah. Biji: Bulat telur, dibalut selaput putih, tebal, coklat. Akar: Tunggang, bercabang, bulat, kecoklatan.
3. Nama Simplisia : Theobromae Pericarpium / Kulit Buah Coklat.
 Theobromae Fructus / Buah Coklat.
 Theobromae Semen / Biji Coklat.
4. Kandungan Kimia : Tanaman coklat mengandung teobromin, kafein, protein, pati dan minyak lemak. Biji mengandung alkaloid, tannin, flavonoid dan saponin, protein, karbohidrat, dan lemak, serta berbagai mineral, di antaranya kalium, natrium, kalsium, besi, seng, tembaga dan mangan. Protein yang terkandung dalam biji coklat itu memiliki kandungan asam amino fenilalanin, tyrosin, dan triptofan dalam jumlah besar.
5. Penggunaan : Penelitian
6. Daftar Pustaka
 - Anonim, <http://www.plantamor.com/Coklat>, diakses tanggal 17 Desember 2010.
 - Anonim, <http://www.warintek.ristek.go.id/coklat>, diakses 23 Oktober 2010.
 - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, CGGI, 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 26 Oktober 2016
 Kepala UPT Materia Medica Batu



A.2 Surat Ijin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 3031/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Direktur RSGM
Fakultas Kedokteran Gigi
Di
Universitas Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama : Veda Chandrika Adnyana
2. NIM : 131610101071
3. Tahun Akademik : VII/ 2013
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Jl. Sunan Derajat No. 32
6. Judul Penelitian : Uji Sitotoksitas Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% pada periodontal dressing terhadap kultur sel Fibroblas Baby Hamster Kidney – 21 (BHK – 21)
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience FKG Unej
8. Data/alat yang dipinjam : Incubator, Autoclave, Oven, dll
9. Waktu : Oktober – Selesai
10. Tujuan Penelitian : Untuk menguji Sitotoksitas Ekstrak Kulit Buah Kakao
11. Dosen Pembimbing : 1. drg. Melok Aris, M.Kes., Sp.Perio
2. drg. Tanti Ernawati, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 30 SEP 2016
Dekan I
drg. DA Susilawati, M.Kes
109031986022001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331)333536, Faks. 331991

Nomor : 573 /UN25.8/TL/2017
Perihal : Ijin Penelitian

23 JAN 2017

Kepada Yth
Kepala Pusat Veteriner Farna
Di
Surabaya

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Veda Chandika A |
| 2 | NIM | : 131610101071 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2016/2017 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Sunan Drajat No. 32, Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Uji Sitotoksitas Periodontal Dressing Yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% Pada Kultur Sel Fibroblas Baby Hamster Kidney 21 (BHK 21) |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Pusat Veteriner Farna (pusvetma) Surabaya |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Alat Dan Bahan Uji Sitotoksitas |
| 9 | Waktu | : Januari 2017 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Efek Sitotoksik Periodontal Dressing Yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Kakao 15% |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Melok Aris W, M.Kes,Sp.Perio
2. drg. Tantin Ermawati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

B. Analisis Data

B.1 Hasil Uji Normalitas menggunakan Uji *Spahiro-Wilk*

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
viabilitas saliva	.213	8	.200*	.955	8	.761
saliva+cp	.223	8	.200*	.945	8	.662
saliva+pd	.130	8	.200*	.979	8	.959
saliva+pd+e	.173	8	.200*	.894	8	.257

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

B.2 Hasil Uji Homogenitas menggunakan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.792	3	28	.508

B.3 Hasil Uji Beda Parametrik menggunakan uji *One-way* ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
viabilitas					
Between Groups	2860.021	3	953.340	141.186	.000
Within Groups	189.066	28	6.752		
Total	3049.088	31			

B.4 Hasil Uji Beda Parametrik antar Kelompok menggunakan uji LSD

Multiple Comparisons

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
saliva	saliva+cp	1.508625	1.299266	.255	-1.15280	4.17005
	saliva+pd	20.619500*	1.299266	.000	17.95807	23.28093
	saliva+pd+e	18.528375*	1.299266	.000	15.86695	21.18980
saliva+cp	saliva	-1.508625	1.299266	.255	-4.17005	1.15280
	saliva+pd	19.110875*	1.299266	.000	16.44945	21.77230
	saliva+pd+e	17.019750*	1.299266	.000	14.35832	19.68118
saliva+pd	saliva	-20.619500*	1.299266	.000	-23.28093	-17.95807

	saliva+cp	-19.110875*	1.299266	.000	-21.77230	-16.44945
	saliva+pd+e	-2.091125	1.299266	.119	-4.75255	.57030
saliva+pd+e	saliva	-18.528375*	1.299266	.000	-21.18980	-15.86695
	saliva+cp	-17.019750*	1.299266	.000	-19.68118	-14.35832
	saliva+pd	2.091125	1.299266	.119	-.57030	4.75255

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

C. Alat dan Bahan Penelitian

C1. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao



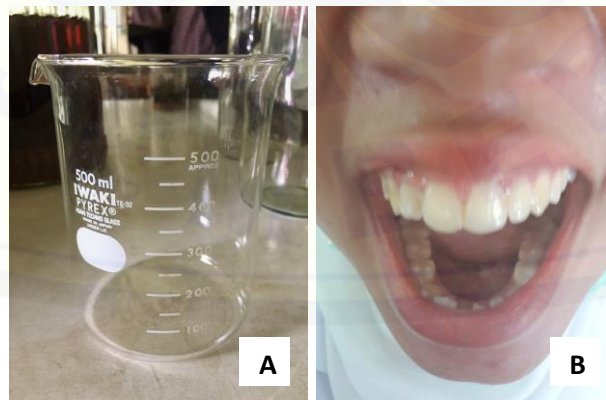
A. Kulit buah kakao, B. Proses penyaringan ekstrak, C. Evaporator, D. Aseton 70%, E. Aquades, F. Juicer

C.2 Pembuatan *Periodontal Dressing*



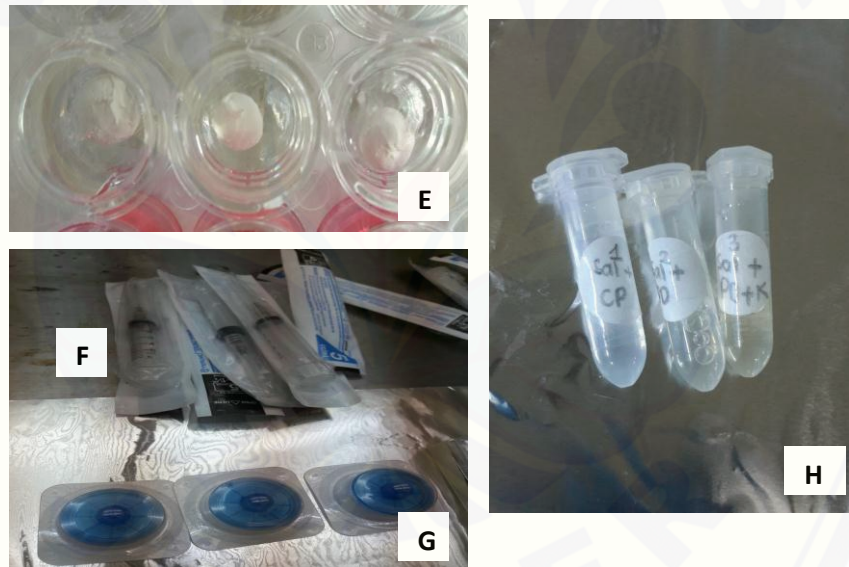
A. *Zinc Oxide*, B. *Rosin*, C. *Hydrogenated fat*, D. *Periodontal dressing Coe-pak*.

C.3 Tahap Penyarangan Saliva



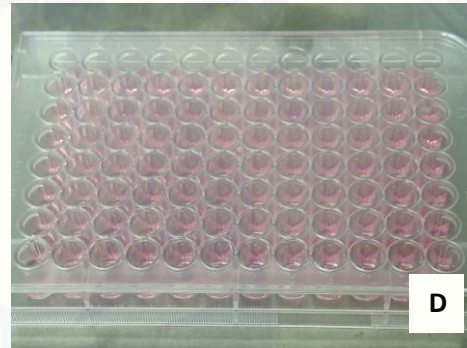
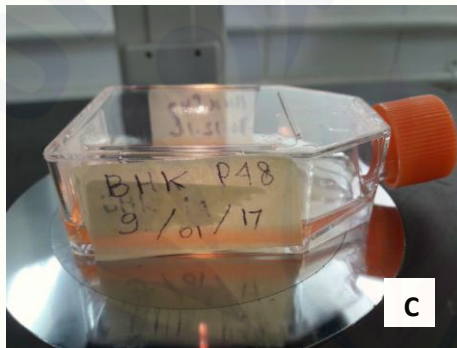


A. *Beaker glass*, B. Keadaan rongga mulut responden, C. Penyaringan saliva, D. Saliva steril



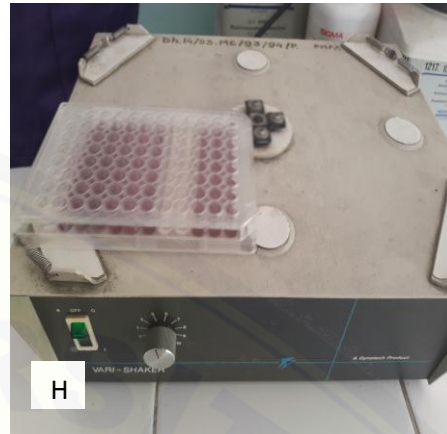
E. Perendaman *periodontal dressing* dalam saliva, F. Syringe, G. Milipore filter, H. Hasil perendaman yang telah difilter

C.3. Uji Sitotoksitas

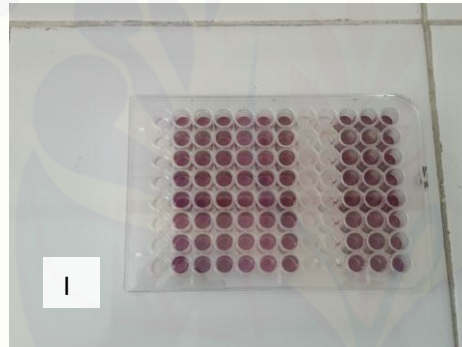


A. Tahap panen kultur sel, B. Inkubator, C. Sel Fibroblas BHK-21 dalam botol Roux, D. Well-96





E. Bahan untuk uji sitotoksitas (Versen tripsin, Media Eagle, PBS, Sel Fibroblas),
F. Elisa Reader, G. Garam MTT, H. Plate shaker.



I. Well setelah diberikan garam MTT dan DMSO, J. Pipet eppendorf